



⑫A **Terinzagelegging** ⑪ **8720643**

Nederland

⑲ NL

⑤4 **Monoclonale antilichamen.**

⑤1 Int.Cl.: C07K 15/04, C12N 5/00, C12N 15/00, C12P 21/00, A61K 31/395, G01N 33/577.

⑦1 Aanvrager: Nippon Shinyaku Co., Ltd. te Kyoto, Japan.

⑦4 Gem.: Drs. A. Kupecz c.s.  
Octrooibureau Los en Stigter B.V.  
Postbus 20052  
1000 HB Amsterdam.

②1 Aanvraag Nr. 8720643.

⑧6 Aanvraagnummer oorspronkelijke internationale aanvraag: PCT/JP87/00919.

②2 Ingediend 26 november 1987.

③2 Voorrang vanaf 15 december 1986.

③3 Land van voorrang: Japan (JP).

③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 298167/86.

⑥2 --

④3 Ter inzage gelegd 1 september 1989.

⑧7 Publicatiedatum oorspronkelijke internationale aanvraag: 30 juni 1988.

⑧7 Publicatienummer oorspronkelijke internationale aanvraag: WO88/04668.

Deze octrooiaanvraag werd ingediend als internationale octrooiaanvraag onder de bepalingen van het Verdrag tot samenwerking inzake octrooien (PCT). De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van een Nederlandse vertaling van de oorspronkelijk in een andere taal ingediende beschrijving met conclusie(s) en tekening(en). De Nederlandse octrooiaanvraag wordt geacht te zijn ingediend op de indieningsdatum van de internationale octrooiaanvraag.

Monoclonale antilichamen.

Terrein van de uitvinding

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op monoclonale antilichamen, die in staat zijn om een fodrine specifiek te herkennen.

5 Fodrine is een soort cytoskeletproteïne en wordt ook calspectine genoemd. Twee subeenheden met molecuulgewichten van 240 K ( $\alpha$ ) en 235 K ( $\beta$ ) zijn bekend.

Achtergrond van de uitvinding

10 Cytoplasma, dat een bestanddeel van de cel uitmaakt, ziet er uit als een gelei-achtige materiaal, waarin een kern en een celorganel zijn gesuspendeerd, doch in het inwendige ervan 3 soorten van proteïne samengestelde cytoskelets aanwezig zijn t.w. microfilamenten, microtubules en vezels met een intermediate diameter. Deze cytoskelets spelen niet alleen een rol bij het handhaven van de vorm van de  
15 cellen maar nemen ook deel in celdeling of beweging en doen voorts mee aan transport van celorganellen of vesicles.

In de laatste jaren is het duidelijk geworden, dat cytoskelets en een regulatiesysteem ervan sterk betrokken  
20 zijn bij een intracellulair informatietransfersysteem, dat celoppervlaktereceptoren verbindt met de kern en expressie van celfuncties. Fodrine is aanwezig in de synapse kant van de zenuwcellen en wel in grote hoeveelheden, zodat het aangenomen wordt, dat een fodrine een belangrijke rol kan spelen  
25 bij geheugentransfer.

Aan de andere kant waar normaal cellen veranderen in kanker in vitro, morfose, groei, beweging, metabolisme, enz. van de cellen in sterke mate veranderen. In het bijzonder wordt verandering in een morfose van cellen gebruikt als  
30 de meest karakteristieke index van kankervorming of transformatie van de cellen.

Bekend is, dat deze verandering in morfose in overeenstemming is met de verandering in morfose van actine-strengen, die een stroom van microfilamenten als één van het  
35 cytoskelet zijn. Actine is een proteïne, dat het cytoskelet vormt, terwijl het proteïne, dat actine met het celmembraan

verbindt een fodrine is.

Volgens recente onderzoeken is het duidelijk ge-  
worden, dat hormonen of groeifactoren zich verbinden met re-  
ceptoren, die op de celmembranen aanwezig zijn en wel aan de  
5 buitenkant van de cellen en deel uitmaken van fosfolipiden  
in de cellen of celmembranen of in een toename van proteïne-  
geassocieerde kinase of intracellulaire calciumionconcentra-  
tie participeren, hetgeen resulteert in de activering ervan.

Fodrine is een cytoskeletproteïne deel uitmakend  
10 van een bekledingsproteïne van een celmembraan en tegelijker-  
tijd wordt aangenomen, dat fodrine rechtstreeks deelneemt in  
een informatietransferfunctie van cellen. Dientengevolge werd  
recentelijk voorgesteld dat celmembraan-geassocieerde pro-  
teïne met deze functies aangeduid wordt als membraanskelet  
15 (membraanproteïne), en niet als het tot nu toe gebruikte  
cytoskeletproteïne. Aangenomen wordt, dat de op dit terrein  
verkregen onderzoeksresultaten een nieuw belang zouden spe-  
len bij de celbiologie van een fodrine.

Voorts volgens een andere vinding is het duidelijk  
20 geworden, dat enkele van de produkten uit carcinogene genen  
receptoren voor groeifactoren van celmembranen of proteïne-  
kinase vormen. Dientengevolge kan gesteld worden, dat het  
duidelijk geworden is, dat cytoskeletproteïne op de een of  
andere manier zou participeren in het carcinogene mechanisme.

25 Volgens de bovengenoemde onderzoeken aan een  
transformatie in vitro is het duidelijk geworden, dat de  
hoeveelheid van een fodrine door transformatie in cellen  
afneemt. Het is duidelijk geworden, dat fodrine zijn mor-  
fose wijzigt bij transformatie.

30 Uit het voorgaande wordt voorgesteld, dat er een  
correlatie zal bestaan tussen de aanwezigheid van een fo-  
drine en transformatie. Voorgesteld is ook, dat identi-  
ficatie of kwantitatieve bepaling van het fodrine in een cel  
een mogelijkheid zou vormen bij de diagnose van kanker.

35 Aangenomen wordt ook, dat een fodrine ook zou par-  
ticiperen bij celdifferentiatie als één van het membraanske-  
let.

Als achtergrond, waarbij cellen een dynamische ver-

andering in de morfose ervan veroorzaken is verondersteld, dat een signaaltransductiesysteem deel zou nemen in een celmembraan. Onder andere, verandering in morfose, begeleid door differentiatie gaat gepaard met kwalitatieve en kwantitatieve verandering in een hoeveelheid van het gesynthetiseerde celmembraan, fosforylatie, enz. Teneinde de werkelijke conditie voor celdifferentiatie te leren kennen lijkt het derhalve van belang te zijn de relatie tussen differentiatie en verandering in een fodrine op te helderen.

10 Voorgesteld is ook, dat een fodrine geschikt zou  
- zijn voor diagnose van specifieke ziektes, bijv. musculaire dystrofie.

Aangenomen wordt, dat musculaire dystrofie veroorzaakt wordt door activering van een bepaalde protease in vivo met sommige morbide verandering als een start daarbij onder ontleding van cytoskeletproteïnen. In een musculaire dystrofie model is het bekend, dat een fodrine ontleeft (Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 776-780 (1984)), waaruit blijkt, dat een spoor van fodrine als een marker geschikt zou zijn voor  
20 diagnose van deze ziekte.

Het is in detail beschreven, dat een fodrine een bijzonder nuttige stof is voor de opheldering van celdifferentiatie, voor opheldering van het mechanisme van transformatie, alsmede een marker voor specifieke ziektes, etc.  
25 De mogelijkheid om fodrine te identificeren en fodrine kwantitatief te bepalen zou resulteren in een bijzonder revolutionaire significantie op medisch en biochemisch terrein.

Gebleken is, dat de aanwezigheid van een antilichaam, dat in staat is specifiek te herkennen, maakt identificatie en kwantitatieve bepaling mogelijk door het labelen van het antilichaam, hetgeen een veelbelovend middel zou zijn voor het ophelderen van cytobiologisch belang van een fodrine.

De aanwezigheid van een polyclonaal antilichaam, dat in staat is een fodrine te herkennen, was bekend. Opheldering van kwalitatieve verandering (afname) in een fodrine begeleid door transformatie in onderzoeken, die mogelijk waren geworden door identificatie en kwantitatieve bepaling

van een fodrine door het erop aanbrengen van het polyclonale antilichaam is beschreven in (Koji) Owada, "Cell Engineering", vol. 5, nr. 4, 314 (1986)).

Het is echter bekend, dat een fodrine twee sub-  
5 eenheden heeft t.w.  $\alpha$  en  $\beta$  en dat fodrine een groot aantal plekken vertoont voor het binden van veel cytoskeletproteïnen. Dienovereenkomstig herkent het polyclonale antilichaam niet alleen een bepaalde plaats maar ook andere plaatsen van fodrine, zodat elk specifiek effect, gebaseerd op herkenning  
10 van zijn specifieke plaats niet te verwachten was. Wanneer hier als antilichamen, die niet in staat zijn antigenen te herkennen anders dan een fodrine, namelijk monoclonale antilichamen, die in staat zijn een fodrine specifiek te herkennen zouden worden gebruikt, zou het bovengenoemde probleem  
15 worden opgelost.

Glenney en medewerkers maakten gebruik van monoclonale antilichamen, die in staat zijn een fodrine specifiek te herkennen, waarbij ze gebruik hebben gemaakt van hun eigen middelen (J. Mol. Biol., 167, 275-295 (1983)). Burridge en  
20 medewerkers hebben ook de aanwezigheid van monoclonale antilichamen opgehelderd, die in staat waren een fodrine specifiek te herkennen. (J. Cell Biol., 98, 1363-1377 (1984)).

Volgens deze onderzoeken waren de erbij gebruikte monoclonale antilichamen met daarin proteïnen die  
25 IgM en IgG<sub>1</sub> als subklasse werden genoemd. Een monoclonaal antilichaam omvat diverse soorten afhankelijk van de wijze van verzamelen, aard, enz., terwijl elke soort zijn eigen karakteristieken heeft. Zo zijn bijvoorbeeld monoclonale antilichamen met subklasse IgM en subklasse IgG<sub>1</sub> inferieur  
30 wat betreft haar bindingsvermogen aan proteïne A die later werd beschreven, terwijl het niet mogelijk was daarop radioimmunoprecipitatie (RIP) toe te passen als een effectief middel voor de kwantitatieve bepaling van een fodrine.

In het licht van bovengenoemde publikaties hebben  
35 Glenney en medewerkers voor identificatie van een fodrine o.a. gebruik gemaakt van de Western blottingmethode, ELISA en een methode van immunocytochemie; deze methoden zijn echter niet geschikt voor het herkennen van fodrine in een

8720643.1

natuurlijke toestand maar wel voor het herkennen van een fodrine in gedenatureerde toestand en wel door bijvoorbeeld solubilisatie, enz. Burridge en medewerkers hebben de Western blottingmethode toegepast alsmede de methode van immunocytochemie, welke methoden echter geen methoden zijn om een fodrine in een natuurlijke toestand te herkennen.

Beschrijving van de uitvinding

Zoals boven in detail beschreven zijn de identificatie en kwantitatieve bepaling van een fodrine van groot belang uit medisch en fysiologisch oogpunt bezien. Bovendien is het voor zijn identificatie en kwantitatieve bepaling gewenst monoclonale antilichamen te verschaffen, die geschikt zijn voor het specifiek herkennen van een fodrine in een natuurlijke toestand.

Een doel van de onderhavige uitvinding is het verzamelen van dergelijke ideale monoclonale antilichamen.

Met het oog op de boven beschreven actuele situatie heeft de uitvinder zich geheel gewijd aan het vinden van monoclonale antilichamen, die geschikt zijn voor bovengenoemd doel en heeft onderzoeken verricht en als resultaat daarvan heeft hij met succes de cellen gevonden, die geschikt zijn voor het produceren van de monoclonale antilichamen en slaagde erin monoclonale antilichamen te verzamelen, die geschikt zijn voor het herkennen van een fodrine uit deze cellen.

De kern van de onderhavige uitvinding ligt in het creëren van monoclonale antilichamen, onder subklasse G<sub>2</sub> (daaronder inbegrepen G<sub>2a</sub> en G<sub>2b</sub>), die geschikt zijn voor het specifiek herkennen van een fodrine. De door de onderhavige uitvinder gevonden monoclonale antilichamen zijn niet alleen in staat om met een gedenatureerde fodrine op een zeer gevoelige wijze te reageren zelfs onder zware condities maar ook een fodrine in een natuurlijke toestand te herkennen, hetgeen in de hierna volgende voorbeelden zal worden beschreven.

Bovendien zijn de monoclonale antilichamen in staat met een fodrine te reageren en naast de volgende species, zoals varkens, mensen, muizen, enz., terwijl hun toe-

8720643.

passing over een groot terrein kan worden uitgespreid.

Bovendien wordt opgemerkt, dat de monoclonale antilichamen volgens de uitvinder omvatten zulke, die in staat zijn nieuwe subeenheden (anders dan  $\alpha$  en  $\beta$ ) van een fodrine te herkennen, waarvan de herkenning niet mogelijk  
5 zou zijn met polyclonale antilichamen. Zoals uit de hierna volgende voorbeelden nader zal blijken is dit een feit, dat door de onderhavige uitvinder voor de eerste keer is ontdekt.

Hierna zal een werkwijze voor het verzamelen van  
10 de stoffen volgens de onderhavige uitvinding in volgorde worden beschreven.

Het vaststellen van een cellijn, die in staat is voor het produceren van de monoclonale antilichamen, die geschikt zijn voor het specifieke herkennen van een fodrine  
15 in de onderhavige uitvinding vindt plaats door het meegeven van een groeifunctie aan cellen, die zijn afkomstig van een geïmmuniseerd dier of cellen, verkregen door het immuniseren van cellen, afkomstig van een dier, waaronder de mens in vitro (geïmmuniseerde cellen) door fusie van myelomacellen  
20 enz. en door herhaalde selectie van de bewuste cel.

Na bereiding van geïmmuniseerde cellen wordt een antigeen (in de onderhavige uitvinding een fodrine wordt het antigeen) bereid voorafgaande daaraan.

Als antigeen kan ook een niet-gezuiverde fodrine  
25 worden gebruikt, waarbij echter de gewenste resultaten worden bereikt door gebruikmaking van een grondig gezuiverd antigeen.

Na zuivering van het antigeen wordt een humane of dierlijke weefsel gehomogeniseerd op een op zichzelf bekende  
30 wijze en vervolgens gecentrifugeerd, enz. onder oplevering van precipitaten. De precipitaten worden geroerd in een buffer op een op zichzelf bekende wijze. Een fodrine is aanwezig als een bekledingsstructuur van een celmembraan en derhalve is het noodzakelijk in de buffer een zoutconcentratie  
35 op te voeren met bijvoorbeeld kaliumchloride of dergelijke. Na een dergelijke behandeling gaat men wederom centrifugeren, gevolgd door een behandeling van het precipitaat met ammoniumsulfaat op een op zichzelf bekende wijze.

8720643.1

De precipitaten worden afgezonderd, waarna het ammoniumsulfaat wordt verwijderd door dialyse teneinde de precipitaten te zuiveren. Na zuivering kan een anionogene ionuitwisselingsharskolom worden toegepast. De toepassing van bijvoorbeeld Mono Q (gedeponeerd handelsmerk) is gewenst. Verder bij gelfiltratie kunnen diverse methoden op geschikte wijzen worden aangepast maar het is bijzonder gunstig gebruik te maken van Super Rose Column 6 of Super Rose Column 12 (gedeponeerde handelsmerken).

Voorts als een voorbeeld van het produceren van geïmmuniseerde cellen kan nog genoemd worden een methode voor de produktie van de geïmmuniseerde cellen door het toedienen van een antigeen in het lichaam van het dier, gevolgd door het verzamelen van de dierlijke cellen.

Als dier kan men gebruik maken van dieren zoals muizen, enz. zoals tot nu toe in experimenten langs een conventionele methode toegepast. Gewenst is, dat het antigeen intraperitoneaal, enz. wordt toegediend. Het is geschikt, dat de toediening plaatsvindt door vermenging van het antigeen met Freund's complete toevoegsel op een op zichzelf bekende wijze, gevolgd door toediening van het mengsel. Volgens de onderhavige uitvinding dient de toediening verscheidene keren te worden herhaald en wel met diverse weken tussenpozen na de toediening. Het is voldoende, dat de toedieningsinterval twee weken is en dat de frequentie van de toediening bij voorkeur 2 tot 4 keer is.

Dan wordt het dier gedood en zijn orgaan zoals bijvoorbeeld een mild of dergelijke wordt verwijderd teneinde de cellen op een op zichzelf bekende wijze te verzamelen.

Hierna wordt de cel voorzien met myelomacellen ten behoeve van het verlenen van een groeifunctie aan de geïmmuniseerde cellen hierna nader beschreven.

De hier gebruikte myelomacellen zijn die, welke zijn verkregen door het kweken van bijvoorbeeld X63-Ag8 653 stam, enz. bijvoorbeeld in een medium met daarin FCS (runderfoetusserum). Bij voorkeur worden cellen bij de logaritmische groeifase gebruikt.

8720643.1

Als de methode voor celfusie kan men gebruik maken van een methode, waarbij geïmmuniseerde cellen en myelomacellen worden gemengd in een celgetalverhouding van 1 : 1 tot 10 : 1 onder gebruikmaking van een celfusiemiddel, zoals 5 polyethyleenglycol of elektrische stimulatie, enz.

Na fusie worden de cellen gekweekt in een zogenaamde HAT medium, dat is aangevuld met hypoxanthine, aminoptericine en thymidine, onmiddellijk of na preïncubatie in een gewoon medium, waarbij slechts cellen, gefuseerd in combinatie van geïmmuniseerde cellen en myelomacellen, kunnen 10 worden geselecteerd.

Volgens de onderhavige uitvinding kan de selectie van antilichaam-producerende cellen worden gerealiseerd, terwijl een antilichaamtiter wordt vastgesteld door middel 15 van een enzym-gekoppelde immunoabsorptieproef (ELISA), enz.

De cellen, waarin een antilichaamtiter kan worden vastgesteld kunnen geselecteerd worden door herhaalde incubatie in een van putjes voorziene plaat en in een Petrischaal op een op zichzelf bekende wijze, waarna de antilichaamproduktiviteit, immunochemische test van geproduceerde antilichamen, antigeen-specificiteitstest enz. worden uitgevoerd. 20

Voorts kan de selectie worden uitgevoerd onder gebruikmaking van een micromanipulator of een celsorteerder.

De cellen volgens de onderhavige uitvinding zijn 25 in staat de monoclonale antilichamen volgens de onderhavige uitvinding te produceren en wel op continue wijze in een normale toestand. Waar dientengevolge de monoclonale antilichamen volgens de uitvinding worden gebruikt kan de bovenste laag van de kweekoplossing van de cellen volgens de 30 uitvinding direkt worden gebruikt als een oplossing van de monoclonale antilichamen volgens de uitvinding.

Voorts kunnen de monoclonale antilichamen volgens de uitvinding geproduceerd worden door toediening van antilichaam-producerende cellen aan het lichaam van het dier, 35 dat gewoonlijk voor experiment wordt gebruikt, bijv. muizen, enz. (bijvoorbeeld intraperitoneaal), gevolgd door het verzamelen van de vloeistof uit het dier, bijvoorbeeld ascites enz.

8720643.1

Teneinde de monoclonale antilichamen volgens de onderhavige uitvinding te zuiveren en te verzamelen uit de kweekoplossing van de cellen volgens de onderhavige uitvinding of de asciten kunnen de monoclonale antilichamen worden verzameld, bijvoorbeeld door precipitatie met ammoniumsulfaat, ionuitwisselingschromatografie enz.

De aldus verzamelde monoclonale antilichamen kunnen worden opgeslagen als stabiele stof door daaraan toe te voegen, bijvoorbeeld diverse bufferoplossingen en indien noodzakelijk een zout of voorts een azide enz., of door middel van vriesdrogen enz.

Identificatie van elke klasse immunoglobulinen in deze antilichamen kan plaatsvinden door toepassing van ELISA onder gebruikmaking van klasse-specifieke antilichamen.

Door gebruik te maken van de aldus verkregen monoclonale antilichamen, die in staat zijn een fodrine specifiek te herkennen kan identificatie en kwantitatieve bepaling van de fodrine in een monster, afkomstig van het organisme worden uitgevoerd.

De methode voor het identificeren van een fodrine, onder gebruikmaking van de monoclonale antilichamen volgens de onderhavige uitvinding, die gekenmerkt wordt door de toepassing van de Western blottingmethode zal hierna worden beschreven.

Deze methode is geschikt voor het identificeren en kwantitatief bepalen van fodrine, die aanwezig is in een monster van organisme-origine. D.w.z. een fodrine of een monster van organisme-origine met daarin een fodrine wordt gefractioneerd door SDS-polyacrylamidegelelektroforese op een op zichzelf bekende wijze en vervolgens "blotted" op een nylonmembraan of een nitrocellulosemembraan. De op het membraan overgebrachte fodrine wordt gebonden aan het monoclonale antilichaam, dat vervolgens gebonden wordt aan proteïne A, die is gelabeld met  $^{35}\text{S}$  of  $^{125}\text{I}$ . In dit geval worden telkens door grondig wassen het overmaat monoclonale antilichaam en proteïne A verwijderd. Door aldus te werk te gaan is  $^{125}\text{I}$  of  $^{35}\text{S}$  aanwezig bij 240K ( $\alpha$ ) en 235K ( $\beta$ ), die specifieke molecuulgewichten zijn voor fodrine, of bij de plaats,

8720643.1

die overeenkomt met de molecuulgewichten van beide in verhouding tot de hoeveelheid. Dan kan  $^{125}\text{I}$  of  $^{35}\text{S}$  worden gedetecteerd door middel van een RI-scanner of een autoradiografie, teneinde de fodrine vast te stellen en  
5 kwantitatief te bepalen.

Hierna wordt de methode voor het identificeren van fodrine, gekarakteriseerd door het aanbrengen van RIP daarop nader worden beschreven.

In de RIP worden cellen, die als monster worden  
10 gebruikt, gekweekt in een kweekvloeistof met daarin bijvoorbeeld methionine, die gelabeld is met  $^{35}\text{S}$  of dergelijke, zodat incorporering in de cellen, die een monster wordt, wordt uitgevoerd. Daarna wordt een buffer voor het oplossen aan het monster toegevoegd, waarna het lysaat wordt ver-  
15 kregen. Het monoclonale antilichaam volgens de uitvinding wordt toegevoegd aan het lysaat. Door ze met elkaar te vermengen wordt het antigeen-antilichaamrespons voltooid.

Dan wordt proteïne A-Sepharose of dergelijke daaraan toegevoegd op een op zichzelf bekende wijze. Door het  
20 herhalen van centrifugeren en wassen met buffer worden verontreinigingen anders dan de fodrine op een op zichzelf bekende wijze verwijderd. Daarna wordt elektroforese uitgevoerd op een op zichzelf bekende wijze, gevolgd door detectie van de radioisotope. Wanneer in de monstercellen fodrine  
25 aanwezig is verschijnen er banden bij 240K ( $\alpha$ ) en 235K ( $\beta$ ), die specifieke molecuulgewichten zijn voor fodrine of beide, in verhouding tot het gebruikte monoclonale antilichaam.

Hierna wordt beschreven een methode voor het detecteren van fodrine in organismecellen, gekarakteriseerd  
30 door het toepassen van immunocytochemie.

In geval van kweekcellen worden de cellen ge-immobiliseerd met een geschikte fixatie-oplossing, zoals formaldehyde-fosfaatbuffer (PBS) oplossing enz. en indien noodzakelijk worden cellen blootgesteld aan een behandeling  
35 met Triton onder oplevering van een monster. Het monoclonale antilichaam volgens de onderhavige uitvinding wordt toegevoegd aan het monster, teneinde een antigeen-antilichaamrespons te verkrijgen. Dan wordt het systeem grondig gewassen met fosfaat gebufferde oplossing (PBS). Na reactie met bio-

8720643.

tine-gebonden anti-immunoglobuline als een secundair anti-  
lichaam wordt het reactiemengsel grondig gewassen. Dan wordt  
Fluorescentie-gelabelde avidine tot reactie gebracht met het  
gevormde fodrine-monoclonale antilichaam-biotine-gebonden  
5 secundaire antilichaamcomplex, terwijl de fluorescentie  
wordt waargenomen door middel van een fluorescentiemicros-  
coop onder detectie van een fodrine in de cellen.

In geval van pathologisch weefsel kan gebruik wor-  
den gemaakt van een monster, dat wordt verkregen door fixa-  
10 tie van het weefsel met formaline of andere geschikte fixe-  
ringsoplossingen om teneinde een schijfje te maken, of  
door fixatie van een bevroren schijfje met formaldehyde in-  
dien noodzakelijk, gevolgd door een behandeling met een  
oppervlakte-actieve stof enz. Onder toepassing van soortge-  
15 lijke bewerkingen kan immunocytochemie worden toegepast.

Hierna wordt een experiment beschreven voor het  
aantonen van de relatie tussen differentiatie en de mono-  
clonale antilichamen volgens de onderhavige uitvinding.

Door toepassing van een conventionele celkweek  
20 worden dierlijke cellen gekweekt in een Petrischaal, en één  
dag daarna werd aan de cellen een celdifferentiatie-indu-  
cerend middel, zoals dibutylcyclisch AMP enz. toegevoegd.  
Daarna werd de incubatie gedurende 7 dagen voortgezet, ter-  
wijl een gebruikelijk middel, zoals uitwisseling van het  
25 medium enz. werd toegepast en een proteïne gelabeld met  $^{35}\text{S}$   
enz. daaraan werd toegevoegd. Door toepassing van de boven-  
genoemde middelen van RIP werden identificatie en kwanti-  
tatieve bepaling van fodrine uitgevoerd.

Zoals nader in de voorbeelden zou worden beschre-  
30 ven wordt opgemerkt, dat de hoeveelheden  $\alpha$  en  $\beta$  uit de  
subeenheden van fodrine in dit experiment worden opgevoerd.  
Bovendien de aanwezigheid van een derde subeenheid, die niet  
met polyclonale antilichamen kan worden aangetoond werd voor  
het eerst opgehelderd door toepassing van de monoclonale  
35 antilichamen volgens de uitvinding.

Hierna worden als voorbeelden voor toepassing van  
de monoclonale antilichamen volgens de uitvinding, identifi-  
catie en kwantitatieve bepaling van fodrine in kwalitatieve

8720643.

en kwantitatieve veranderingen bij getransformeerde cellen beschreven.

Onder gebruikmaking van het monoclonale antilichaam 15A1 volgens de onderhavige uitvinding werd de distributie van subeenheid  $\beta$  van een fodrine getraceerd. Polyclonaal antilichaam herkent subeenheden van zowel  $\alpha$  als  $\beta$ , terwijl 15A1 alleen  $\beta$  herkent. Zoals in Voorbeeld IV nader wordt beschreven werden getransformeerde cellen bereid volgens 4 methoden t.w. (1) kinase type RNA virus, (2) niet-kinase type RNA virus, (3) DNA virus en (4) carcinogenetische chemische stof. Hoeveelheden fodrine in de celmembraanfractie en de supernatante fractie in de desbetreffende cellen werden kwantitatief bepaald onder gebruikmaking van 15A1.

De onderhavige uitvinder heeft gevonden, dat een fodrine, gebonden aan het celmembraan, in hoofdzaak een complex (dimeer) van  $\alpha$  en  $\beta$  is, terwijl een fodrine, in cytoplasma door transformatie vrijgekomen geen enkel complex vormt, doch in  $\alpha$  en  $\beta$  wordt geïsoleerd.

In een experiment onder gebruikmaking van een polyclonale antilichaam werd een afname in de hoeveelheid fodrine ( $\alpha$  en  $\beta$ ) als geheel in de getransformeerde cellen volgens (1) tot en met (4), zoals boven beschreven, waargenomen. Door kwantitatieve bepaling van fodrine met 15A1 bleek vrije  $\beta$  te zijn toegenomen. Opgevallen was voorts, dat een verhouding van de toegenomen vrije  $\beta$  tot de gehele fodrine verschillend was bij elk van de methoden (1) tot en met (4). Gesteld kan worden, dat het fenomeen van het afnemen van de totale hoeveelheid fodrine tengevolge van de transformatie, die tot nu toe werd herkend, nauwkeurig kon worden waargenomen en opgehelderd op een belangrijk niveau. Aangenomen wordt, dat de aanwezigheid van een vrije subeenheid de stabiliteit van het membraan zou vernietigen en storing van respons van de cellen de groeifactoren of andere verschillende informatietransfermechanismen zou verstoren. Zulke complexe informatie transferabnormaliteiten konden begrepen worden door het traceren van  $\beta$  subeenheid met 15A1 volgens de uitvinding.

De getransformeerde cellen (1) tot (4) verschillen

8720643.1

van elkaar in de mate van malignantie van elke kanker, verschillen in groei van kanker en ook in respons tegenover anti-kankermiddelen.

In de getransformeerde cellen doet zich een fenomeen voor, namelijk dat vrije fodrine wederom wordt omgezet in ( $\alpha + \beta$ ) type in een celmembraan tengevolge van celdifferentiatie. Dit zou erop wijzen, dat getransformeerde cellen behandeld zouden kunnen worden door celdifferentiatie.

Rekening houdend met het bovengestelde zal het duidelijk zijn, dat de mate van behandeling bepaald kan worden door identificatie en kwantitatieve bepaling van fodrine. Bovendien is het duidelijk, dat de mate van transformatie bepaald kan worden.

Dientengevolge zijn de monoclonale antilichamen volgens de uitvinding, die in staat zijn alleen  $\beta$  subeenheid specifiek te herkennen, geschikt zijn voor de diagnose van kanker.

#### Industriële toepassing

De onderhavige uitvinding maakt mogelijk het verkrijgen van de monoclonale antilichamen, die geschikt zijn voor het specifiek herkennen van een fodrine niet alleen uit gedenatureerde conditie, doch ook uit natuurlijke conditie. De onderhavige uitvinding heeft bovendien geleid tot een methode voor het identificeren van een fodrine in biologische materialen zonder het storen van andere proteïnen, door het toepassen van de antilichamen in immunologische middelen, zoals Western blotting, ELISA, RIP, immunocytochemie enz. Dit is niet alleen een middel voor het nauwkeurig leren van weefsel distributie, intracellulaire distributie en de aanwezigheid van fodrine doch ook als een veelbelovend middel voor het onderzoeken van het verdwijnen of fosforylatie van een fodrine of een fodrine-gebonden proteïne, die een contactpunt is tussen verandering in structuur van cytoskeletproteïne en informatietransfermechanisme in cellen. De monoclonale antilichamen kunnen ruime toepassing vinden voor het ophelderen van fundamentele en belangrijke problemen op medisch en biologisch terrein, zoals de handhaving van een morfose van cellen, beweging, deling, secretie-activiteit,

8720643.1

zenuwsecretie, geheugen en verder kanker, groeiende seniliteit enz.

De monoclonale antilichamen volgens de onderhavige uitvinding omvatten ook die met karakteristieken, zoals (1) 5 geen specificiteit voor species, (2) in staat zijn niet alleen een gedenatureerde fodrine, doch ook een natuurlijke fodrine te herkennen, (3) in staat zijn zelfs een derde subeenheid anders dan  $\alpha$  en  $\beta$  te herkennen onder subeenheden van fodrine en dergelijke. Door nauwkeurige toepassing van de 10 monoclonale antilichamen volgens de onderhavige uitvinding en bekende polyclonale antilichamen kan bijvoorbeeld door bepaling van een verhouding van  $\alpha$  tot  $\beta$ , een verhouding van  $\beta$  tot  $(\alpha + \beta)$ , die subeenheden van fodrine enz. zijn, hetgeen ook van toepassing kan zijn voor meer gedetailleerde ophelde- 15 ring van correlatie van een fodrine in vivo met transformatie van cellen, differentiatie, getransformeerde cellen enz.

Beste uitvoeringsvorm voor het in praktijk brengen  
van de uitvinding

Hierna zal de onderhavige uitvinding nader worden 20 beschreven aan de hand van de voorbeelden, die betrekking hebben op de bereiding en toepassingen van de onderhavige stoffen, welke voorbeelden slechts uitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding zijn, waartoe de uitvinding geenszins beperkt is.

25 VOORBEELD I

(1) Zuivering van antigeen

Aan 100 g varkenshersenen werd een 5-voudige hoeveelheid imidazoolbuffer toegevoegd, gevolgd door homogeniseren met Polytron (gedeponeerd handelsmerk). Daarna werd 30 het centrifugeren uitgevoerd met een super-ultra centrifuge-machine gedurende een uur bij 100.000 G. De supernatant werd verwijderd, waarna de precipitaten werden afgezonderd en aan Tris-buffer werden toegevoegd, welke buffer een 0,6 M kaliumchloride bevatte, gevolgd door roeren gedurende 30 min.

35 Dan werd het centrifugeren uitgevoerd bij 80.000 G gedurende 30 min. De precipitaten werden verwijderd, waarna de supernatant werd afgezonderd, gevolgd door toevoeging van 0,258 g/ml ammoniumsulfaat. Het mengsel werd gedurende 30

8720643,

min bij 4°C bewaard. Dan werd het centrifugeren uitgevoerd bij 200.000 G gedurende 45 min. De precipitaten werden afgezonderd, waarna 30 ml Tris-buffer werd toegevoegd. Na dialyse met dezelfde Tris-buffer werd de gelfiltratie uitgevoerd via een CL-4B (gedeponeerd handelsmerk) kolom van 44 mmØ x 90 cm. Dan werd een ammoniumsulfaatoplossing toegevoegd tot 50% verzadiging, gevolgd door het centrifugeren (200.000 G, een uur). De precipitaten werden afgezonderd en in Tris-buffer opgelost. De oplossing werd gedialyseerd ten opzichte van Tris-buffer, waarna het dialysaat werd onderworpen aan Mono Q Kolom 5/5 ionuitwisselingskolomchromatografie. Gelfiltratie, onder gebruikmaking van Super Rose Kolom 12, leverde 30 mg fodrine op als enige proteïne.

(2) Produktie van geïmmuniseerde cellen

Een mengsel van 0,1 ml oplossing met daarin 100 µg fodrine, verkregen in (1) en 0,1 ml Freund's volledig toevoegsel (bereider DIFCO Co., Ltd.) werd intraperitoneaal aan BALB/c vrouwtjesmuizen van 10 weken oud toegediend. Daarna werd het bovengenoemde mengsel van een fodrine-oplossing en het incomplete toevoegsel (bereid door DIFCO Co., Ltd.) intraperitoneaal tweemaal in 2 weken tussenpozen toegediend. Dan werden de muizen door cervicale dislocatie gedood, gevolgd door aseptische verzameling van de mild.

Van de bovenbeschreven mild werd ca. 1 g op een selector (vervaardigd door BELCO Co., Ltd.) gelegd en door een zeef van ca. 10 µ gepasseerd, terwijl Dulbecco-gemodificeerd MEM (D-MEM) werd toegevoegd onder oplevering van mildcellen, die waren gesuspenderd in D-MEM. De suspensie werd bij 1000 G gedurende 5 min gecentrifugeerd teneinde mildcellen te verzamelen.

De bovengenoemde cellen werden overgebracht in 1 ml van een oplossing, die werd verkregen door toevoeging van 20 mM HEPES-buffer (pH 7,4) aan 0,84% ammoniumchloride-oplossing voor het veroorzaken van hemolyse. De cellen werden verkregen door het centrifugeren bij 1000 G gedurende 5 min. De cellen werden wederom gesuspenderd in D-MEM medium.

(3) Produktie van myelomacellen

8-Azaganine-resistente en immunoglobuline niet-

8720643.]

secretietype muismyelomacellijn X63-Ag8 653 stam werd gekweekt in D-MEM medium, dat werd aangevuld met 20% foetaal kalfserum (FCS) in een incubator van 10% CO<sub>2</sub> bij 37°C.

Cellen bij de logaritmische groeifase werden verzameld en  
5 voor de volgende bewerking gebruikt.

Centrifugeren werd uitgevoerd bij 1000 G gedurende 5 min voor het verzamelen van alleen maar de cellen. De cellen werden verder gesuspenderd in D-MEM medium, waarna het aantal cellen werd geteld met behulp van een hemocytometer.

10 Na centrifugeren bij 1000 G gedurende 5 min werden de cellen gesuspenderd in D-MEM medium.

#### (4) Celfusie

Het D-MEM medium met daarin 10<sup>8</sup> tot 3 x 10<sup>8</sup> geïmmuniseerde cellen, verkregen in (2), werd gemengd met het D-MEM  
15 medium met daarin 10<sup>8</sup> geïmmuniseerde cellen, verkregen in (3). Na het homogeniseren van het mengsel werd het gecentrifugeerd gedurende 5 min bij 1000 G. De supernatant werd verwijderd onder achterlating van de neerslagen. Aan de neerslagen werd druppelsgewijs 1 ml van een oplossing van 25%  
20 (gew/v) polyethyleenglycol 1500 (PEG 1500) (vervaardigd door Boehringer Co., Ltd.) en 37,5 mM HEPES-buffer in verloop van een minuut toegevoegd. Daarna werd het mengsel langzaam verdund met D-MEM medium tot een eindvolume van 10 ml.

D-MEM medium, 10 ml, met daarin 20% FCS werd toe-  
25 gevoegd aan het systeem, gevolgd door centrifugeren bij 1000 G gedurende 5 min. Het D-MEM medium met daarin 20% FCS werd toegevoegd aan de aldus verkregen cellen, onder oplevering van 10<sup>6</sup> cellen/ml. Het mengsel werd overgebracht op een 24 putjes kweekplaat, vervaardigd door Corning Glass Co., Ltd.  
30 in een verhouding van 1 ml/putje.

Incuberen werd uitgevoerd in een incubator met 10% CO<sub>2</sub> bij 37°C gedurende 24 uur. Dan werd HAT oplossing toegevoegd ter verwijdering van cellen anders dan samengesmolten cellen. Incuberen werd gedurende nog eens 2 weken voortgezet.

#### 35 (5) Meting van de antilichaamtiter door ELISA

Elk putje van een microtiterplaat (nr. 001-010-2101) vervaardigd door Dynatech Laboratories Co., Ltd. werd bekleed met 1 µg/ml van het onder (1) verkregen fodrine.

8720643.

De supernatant, 150  $\mu$ l, met daarin een anti-lichaam, dat gemeten dient te worden, werd opgenomen in het putje. Na gedurende 2 uur bij 37°C in een incubator te laten staan werd het systeem gewassen met PBS (fosfaatbuffer).

5 Peroxidase-gebonden schaap anti-muis gehele antilichamen werden daaraan toegevoegd. Na gedurende een uur bij 37°C in een incubator te laten staan en wassen met PBS werd een kleur-ontwikkelaar reagens (ABTS) toegevoegd teneinde gedurende 15 min een kleur te vormen. Dan werd een stopoplossing  
10 (0,1 M citraat - 0,02% natriumazide) toegevoegd teneinde de reactie te stoppen. Dan werd de absorptie van elk putje gemeten met behulp van een multiscan, vervaardigd door Titertech Co., Ltd. ter berekening van de antilichaamtiter.

(6) Selectie van antilichaam-producerende cellen

15 De cellen in het putje, geconfirmeerd door ELISA, werden uitgespreid over een zacht agarmedium in een Petri-schaal van 60 mm  $\phi$ . De incubatie werd uitgevoerd in 10% CO<sub>2</sub> in een incubator bij 37°C gedurende 2 weken onder vorming van kolonies. De gevormde kolonies werden uitgenomen en  
20 overgebracht op een kweekplaat met 24 putjes erin. Een antilichaamactiviteit werd opnieuw geconfirmeerd door ELISA. De cellen in de putjes, waarvan de antilichaamactiviteit werd vastgesteld, werden verspreid over een zacht agarmedium in een Petri-schaal van 60 mm  $\phi$ . De incubatie werd uitge-  
25 voerd in 10% CO<sub>2</sub> in een incubator gedurende 2 weken bij 37°C onder vorming van kolonies. De gevormde kolonies werden eruit genomen en vervolgens overgebracht op een kweekplaat met 24 putjes erin. De antilichaamactiviteit werd wederom  
vastgesteld door ELISA, terwijl de bruikbare cellen werden  
30 geselecteerd.

(7) Verzamelen van antilichamen

(1) De onder (6) verkregen antilichaam-producerende cellen blijken altijd de antilichamen volgens de uitvinding te produceren en vandaar kan de supernatant van de  
35 kweekoplossing, die is verkregen door het kweken van de antilichaam-producerende cellen, rechtstreeks gebruikt worden als de antilichaamoplossing volgens de uitvinding.

(2) Ammoniumsulfaat werd toegevoegd aan de kweek-

8720643.3

oplossing van de antilichaam-producerende cellen, verkregen onder (6), tot een eindconcentratie van 30%. Na centrifugeren werden de precipitaten verwijderd, gevolgd door toevoeging van 20 mM fosfaatbuffer met een pH van 7,4 daaraan.

5 Dan werd dialyse uitgevoerd onder gebruikmaking van dezelfde fosfaatbuffer (met daarin 0,02% natriumazide) ter verwijdering van ammoniumsulfaat. De na de dialyse verkregen vloeistof werd gevriesdroogd onder oplevering van witte poeders.

(3) Pristan, 0,5 ml, werd intraperitoneaal ingespoten in BALB/c mannetjesmuizen, gevolgd door voederen gedurende 2 weken. De antilichaam-producerende cellen, verkregen in (6), werden ingespoten in  $10^6$  tot  $2 \times 10^6$  cellen/muis, gevolgd door voederen gedurende 10 dagen. Onder gebruikmaking van een spuit werd ca. 10 ml van de in de peritoneale holte achtergebleven "ascites" verzameld.

Dan werd aan de "ascites" ammoniumsulfaat toegevoegd tot een eindconcentratie van 30%. Dan werd 20 mM fosfaatbuffer met een pH van 7,4 daaraan toegevoegd, waarna de dialyse werd uitgevoerd onder gebruikmaking van dezelfde fosfaatbuffer (met daarin 0,02% natriumazide) ter verwijdering van ammoniumsulfaat. De vloeistof werd na dialyse gevriesdroogd onder oplevering van witte poeders.

(8) Identificatie voor elke klasse immunoglobuline

Identificatie van elke klasse immunoglobuline werd gerealiseerd door 3 stap ELISA onder gebruikmaking van een klasse-specifieke antilichaam.

De supernatant, 150  $\mu$ l, met daarin een antilichaam, dat gemeten dient te worden, werd opgenomen in een putje, dat gedurende 2 uur bij 37°C in een incubator werd bewaard. Dan werd het systeem gewassen met PBS (fosfaatbuffer). Klasse-specifieke antilichamen (produkten vervaardigd door Biorad Co., Ltd. werden gebruikt als IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 en IgM) werden toegevoegd, gevolgd door reactie gedurende 2 uur bij 37°C. Dan werd het systeem grondig met PBS gewassen. Dan werden daaraan peroxidase-gebonden schape-anti-muis gehele antilichamen toegevoegd. Het mengsel liet men gedurende een uur bij 37°C in een incubator staan. Na wassen met PBS werd een kleur-ontwikkelingsreagens (ABTS)

8720643A

toegevoegd onder vorming van een kleur gedurende 15 min, waarbij elke klasse werd bepaald. Een deel van de resultaten is in Tabel A weergegeven.

TABEL A

	<u>referentie nr.</u>	<u>antilichaam nr.</u>	<u>cellijn</u>	<u>subklasse</u>
5	1	10	3B2	G <sub>2</sub> a
	2	26	5D3	G <sub>2</sub> b
	3	32	7B4	G <sub>2</sub> b
	4	51	9D2	G <sub>2</sub> a
10	5	107	12D4	G <sub>2</sub> b
	6	116	15A1	G <sub>2</sub> a
	7	133	17B3	G <sub>2</sub> a

VOORBEELD II

Identificatie en kwantitatieve bepaling van  
fodrine

(1) Toepassing van Western blotting methode

Nadat fodrine, verkregen in Voorbeeld I en <sup>14</sup>C-ge-labeld molecuulgewicht marker waren onderworpen aan SDS-polyacrylamidegel-elektroforese op een conventionele manier werd proteïne in de gel overgebracht op een nylonmembraan (vervaardigd door Biorad Co., Ltd.) door het aanbrengen van een spanning van 10 V/cm bij 4°C gedurende 4 uur onder gebruikmaking van Transblot Cell van Biorad Co., Ltd. De blokkering werd uitgevoerd onder gebruikmaking van een Tris-buffer (oplossing A) met daarin 0,5% magere melk en 150 mM natriumchloride.

Fodrine monoclonaal antilichaam, welke cellijn 15A1 was, werd opgelost in Tris-buffer (oplossing B) met daarin 0,5 magere melk en 150 mM natriumchloride. Na reactie met het bovenbeschreven membraan bij kamertemperatuur gedurende 2 uur werd het reactieproduct herhaaldelijk grondig gewassen met de oplossing B. Na een fodrine-gebonden antilichaam, die op het membraan was achtergebleven, werd omgezet met <sup>125</sup>I-proteïne A (tot 10<sup>7</sup> dpm) opgelost in oplossing B, waarna het reactieproduct grondig was gewassen en gedroogd. Een röntgenstraalfilm werd blootgesteld aan <sup>125</sup>I op het membraan via autoradiografie, teneinde de banden van fodrine (fig. 1) te detecteren.

8720643.1

(2) Aanbrengen van RIP (radioimmunoprecipitaat)

De cellen, die gebruikt werden als monster werden gekweekt in D-MEM medium, dat werd overgebracht in een Petri-schaal van 100 mm  $\phi$ . Op een dag, voordat het systeem een con-  
5 fluente toestand bereikte, werd  $^{35}\text{S}$ -gelabelde methionine (Amersham SJ 204) toegevoegd in 250  $\mu$  Curie/schaal, gevolgd door incubatie in een incubator met daarin 10%  $\text{CO}_2$  bij 37°C gedurende de nacht. Na verwijdering van het medium werd het systeem met PBS gewassen. Dan volgde solubilisatie met radio-  
10 immunoprecipitatieproef (RIPA) buffer, waarna het lysaat werd ingesteld op een radio-activiteit van  $3 \times 10^6$  c.p.m.

Daaraan werd de onderhavige stof toegevoegd, t.w. 24A2. Het mengsel werd langzaam geroerd bij 4°C gedurende een uur ter completering van een antigeen-antilichaamrespons.

15 Aan het mengsel werd 50  $\mu$ l van een suspensie van proteïne A-Sepharose CL-4B toegevoegd (vervaardigd door Pharmacia Co., Ltd.) in RIPA-buffer in een concentratie van 50%, gevolgd door reactie gedurende een uur bij 4°C. Na de reactie werd het centrifugeren uitgevoerd bij 12000 o.p.m.  
20 gedurende een minuut, waarna de supernatant werd verwaarloosd.

Aan de precipitaten werd 0,5 ml RIPA-buffer toegevoegd, gevolgd door grondig roeren. Het centrifugeren werd uitgevoerd bij 12000 o.p.m. gedurende een minuut, terwijl de  
25 supernatant werd verwaarloosd. Deze bewerking werd 5 keer herhaald.

Een monsterbuffer, 40  $\mu$ l, werd voor elektroforese toegevoegd, gevolgd door verhitting gedurende 2 min bij 100°C.

30 Dan werd 5% gemodificeerde gelelektroforese (SDS-PAGE) uitgevoerd. Na het fixeren van een proteïne in de gel met 7% azijnzuur werd een sensibilisering uitgevoerd met een sensibilisator (Versterker vervaardigd door Amersham Co.).

De gel werd gedroogd, waarna een röntgenstraalfilm  
35 werd blootgesteld ter detectie van banden van proteïne.

Waar fodrine aanwezig was kunnen banden worden geconfirmeerd bij 240K ( $\alpha$ ) en 235K ( $\beta$ ) of beide, afhankelijk van de specificiteit van het toegepaste antilichaam.

8720643.

Een gedeelte van de voorbeelden voor het laten zien welke subeenheid van de fodrine wordt herkend onder gebruikmaking van rattecellen A-31 zal in de onderstaande Tabel B worden vermeld.

5

TABEL B

<u>referentie nr.</u>	<u>antilichaam nr.</u>	<u>cellijn</u>	<u>band</u>
1	10	3B2	$\alpha$
2	76	11A6	$\alpha$
3	92	12A6	$\beta$
10 4	110	13A5	$\alpha + \beta$
5	135	17C5	$\alpha$
6	133	17B3	$\alpha + \beta$

Onder gebruikmaking van humane-afgeleide WI-38 cellen werden proeven op soortgelijke wijze uitgevoerd, waarbij het vastgesteld kon worden, dat de precipitatie met humane fodrine plaatsvond (verg. Tabel C hieronder en fig. 2).

TABEL C

<u>referentie nr.</u>	<u>antilichaam nr.</u>	<u>cellijn</u>	<u>RIP</u>
20 1	79	11B6	-
2	124	15C5	$\pm$
3	138	18B6	+++
4	142	24A2	++
5	145	29A5	+
25 6	133	17B3	$\alpha + \beta$

(3) Toepassing voor immunocytochemie

Humane neuroblast, gekweekt in Chamber Slide 4804, vervaardigd door Miles Co., Ltd. werd gefixeerd met 3,7% formaldehyde-PBS oplossing. Na wassen met PBS 3 keer, werd 10% bovineserum albumine-PBS oplossing eraan toegevoegd teneinde gedurende 30 min blokkering te verkrijgen, waaruit een monster werd bereid.

Fodrine monoclonale antilichaam 15A1, verdund met PBS met 0,02% natriumazide erin tot 200-voudige werd aan het monster toegevoegd. Na reactie bij 4°C gedurende de nacht werd het reactieproduct gewassen met PBS en wel 3 keer.

Biotine-muis gehele antilichamen (vervaardigd door Amersham Co., LTD.) verdund met PBS tot 100-voudige, werd

8720643.7

tot reactie gebracht als een secundair antilichaam gedurende een uur, gevolgd door herhaald wassen met PBS en wel 3 keer.

Na reactie met een 100-voudige verdunde strepto-  
5 avidine-FITC (vervaardigd door Amersham Co., Ltd.) oplossing gedurende nog eens een uur bij kamertemperatuur werd het systeem grondig gewassen en onder een fluoressentiemicroscoop onderzocht, waarbij in een neuroblast fodrine kon worden waargenomen (fig. 3).

10

VOORBEELD III

Identificatie en kwantitatieve bepaling van fodrine in celdifferentiatie

GOTO cellen van humane neuroblastoma vastgestelde  
cellijn werden gekweekt in  $5 \times 10^4$  cellen/ml in een 100 mm  $\emptyset$   
15 kunststof Petri-schaal. Na het vaststellen van het kleven van de cellen werd 1 mM tot 2 mM dibutyl cyclisch AMP of 20 nM tetradecaforbolacetaat (TPA) aan het medium toegevoegd ter inductie van differentiatie. Na incubatie gedurende een week in aanwezigheid van een differentiatie-inleider werden  
20 de cellen gelabeld met  $^{35}\text{S}$ -methionine of  $^{32}\text{PO}_4$ . Dan na solubilisatie met RIPA buffer, werd een hoeveelheid fodrine gesynthetiseerd en verandering in fosforylatie in differentiatie-inductie gedetecteerd. De resultaten zijn weergegeven in fig. 4.

25

Waargenomen kan worden, dat door differentiatie-inductie de gesynthetiseerde hoeveelheden  $\alpha$  en  $\beta$  subeenheden toenamen doch de mate van fosforylatie niet was gewijzigd.

VOORBEELD IV

Kwantitatieve bepaling van fodrine in getransformeerde cellen

30

In diverse in vitro transformatiesystemen werden de totale hoeveelheden fodrine in cellen en hoeveelheden van fodrine in de membraanfractie en de supernatantfractie onderzocht.

35

Contrôle stelt cellen voor voorafgaande aan de transformatie. Elke transformatiemethode wordt voorgesteld als volgt.

(1) RNA virus (kinasetype)

(2) RNA virus (niet-kinasetype)

(3) DNA virus

(4) Carcinogene chemische stof

De totale hoeveelheid fodrine werd kwantitatief be-  
5 paald onder gebruikmaking van bekende polyclonale anti-  
lichamen (beschreven in Cell Engineering, 5, nr. 4). Voor  
een kwantitatieve bepaling voor de hoeveelheden fodrine in  
de membraanfractie en in de supernatantfractie werd 15A1 van  
de onderhavige uitvinding gebruikt. De membraanfractie en de  
10 supernatantfractie werden bereid onder toepassing van conven-  
tionele zuiveringsmethoden. Elk monster werd afgezonderd door  
elektroforese en door het omzetten van het aantal tellingen  
op een filter in numerieke figuren via een  $\gamma$ -scintillatie-  
teller volgens de eerder genoemde Western blotting methode.  
15 De resultaten zijn in Tabel D vermeld.

Opgemerkt wordt, dat in normale cellen als  
contrôle een verhouding van een vrije  $\beta$  subeenheid aanwezig  
is in ca. 5%, terwijl in de cellen getransformeerd met RNA  
virus, in de cellen getransformeerd met DNA virus en in de  
20 cellen getransformeerd met carcinogene chemische stof de  
verhouding toeneemt met resp. 30 - 50%, 20 - 30% en 10%.

TABEL D

	<u>totale</u> <u>hoeveelheid</u>	<u>membraan-</u> <u>fractie</u>	<u>supernatant-</u> <u>fractie</u>
25 contrôle	100	80 (80%)	5 (5%)
(1)	40	10 (25%)	20 (50%)
(2)	60	20 (33%)	20 (33%)
(3)	60	30 (50%)	20 (33%)
(4)	60	20 (33%)	10 (17%)

30 Elk numeriekfiguur stelt een relatieve numerieke  
waarde voor, waneer een telling van de  $\gamma$ -scintillatieteller  
van de contrôlecellen in de totale hoeveelheid 100 uitmaakt.  
De numerieke waarde tussen haakjes stelt een hoeveelheid,  
betrokken op de totale hoeveelheid voor.

35 Korte beschrijving van de tekeningen

Fig. 1 toont de resultaten, die zijn verkregen  
door identificatie van een fodrine door het aanbrengen van  
het antilichaam 15A1, verkregen in de voorbeelden volgens de

87 20643.

Western blotting methode. In de figuur toont a t/m d een patroon van gezuiverde fodrine, een membraanfractie van ratte-hersenen, erythrocyte membraanfractie en een molecuulgewicht marker alsmede numerieke figuren molecuulgewichten voorstellen.

Fig 2 toont de resultaten, onderzocht door het aanbrengen van een fodrine gesynthetiseerde gekweekte WI-38 cellen voor het aanbrengen van middelen van RIP. In de figuur stellen a, b en c een patroon van een molecuulgewicht marker voor, één verkregen wanneer antilichaam 24A2 wordt omgezet met cellysaat en één voor contrôle, waarbij geen antilichaam werd toegevoegd.

Fig. 3 is een foto, die resultaten van de onderhavige stof, 15A1, toont, verkregen door toepassing van middelen van immunocytochemie bij gekweekte neuroblastoma en stelt morfosis van het organisme voor, wanneer neuroblast werd onderzocht met behulp van een fluoressentiemicroscoop.

Fig. 4 stelt hoeveelheden van een gesynthetiseerde fodrine voor en verandering in fosforylatie, wanneer een neuroblastoma-vastgestelde cellijn werd blootgesteld aan differentiatie-inductie, welke verkregen werden door radio-immunoprecipitatie. Elk getal in de figuur stelt het volgende voor.

In de figuur 1 is  $^{14}\text{C}$ -gelabeld molecuulgewicht marker (200K myosine), 2 t/m 9 elk stelt resultaten voor, die zijn verkregen onder gebruikmaking van gesolubiliseerde lysaten gelabeld met  $^{35}\text{S}$ , waarbij polyclonale anti-fodrine antilichaam werd gebruikt in 2, 4, 6 en 8 en 18B6 volgens de onderhavige uitvinding werd gebruikt in 3, 5, 7 en 9 als antilichaam. 2 en 3 zijn contrôles, 4 en 5 zijn TPA, 6 en 7 zijn 1 mM dibutyl cyclisch AMP en 8 en 9 zijn 2 mM dibutyl cyclisch AMP.

10 t/m 15 stellen resultaten voor, die zijn verkregen onder gebruikmaking van een gesolubiliseerd lysaat, gelabeld met  $^{35}\text{P}$ , waarbij polyclonaal werd gebruikt in 10, 12 en 14 en 15A1 werd gebruikt in 11, 13 en 15 als antilichaam. 10 en 11 stellen contrôles voor, 12 en 13 zijn 20 nM TPA en 14 en 15 zijn 1 mM dibutyl cyclisch AMP.

8720643.

CONCLUSIE

Monoclonale antilichamen, g e k e n m e r k t  
door de volgende twee eigenschappen (1) en (2):

- (1) dat deze een fodrine specifiek herkennen, en
- (2) dat de subklasse in elke klasse van immunoglo-  
buline G<sub>2</sub> is.

8720643.

1/3

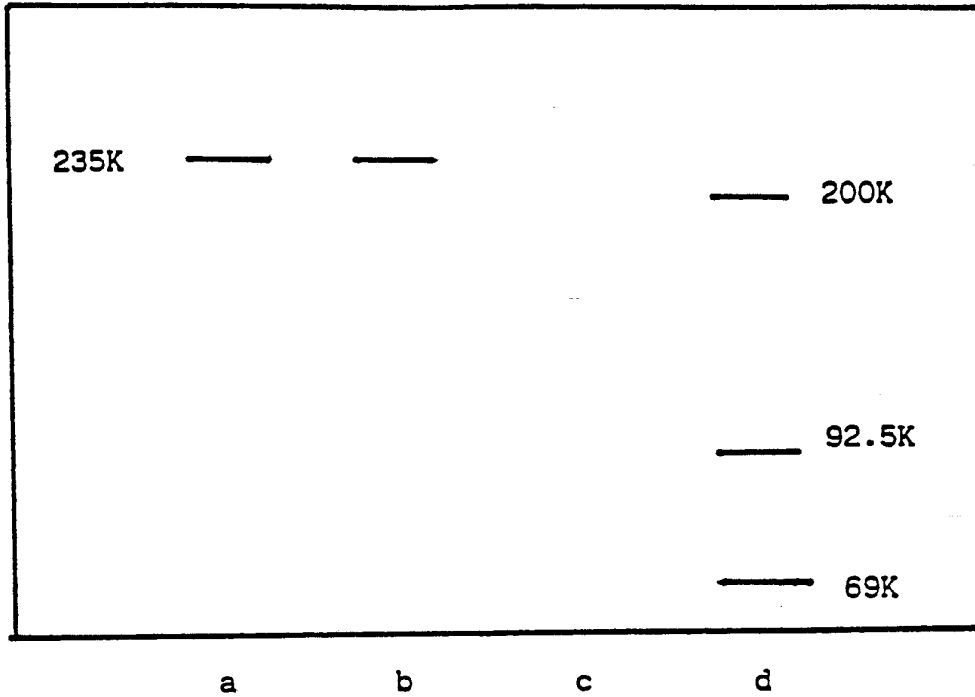


fig.1

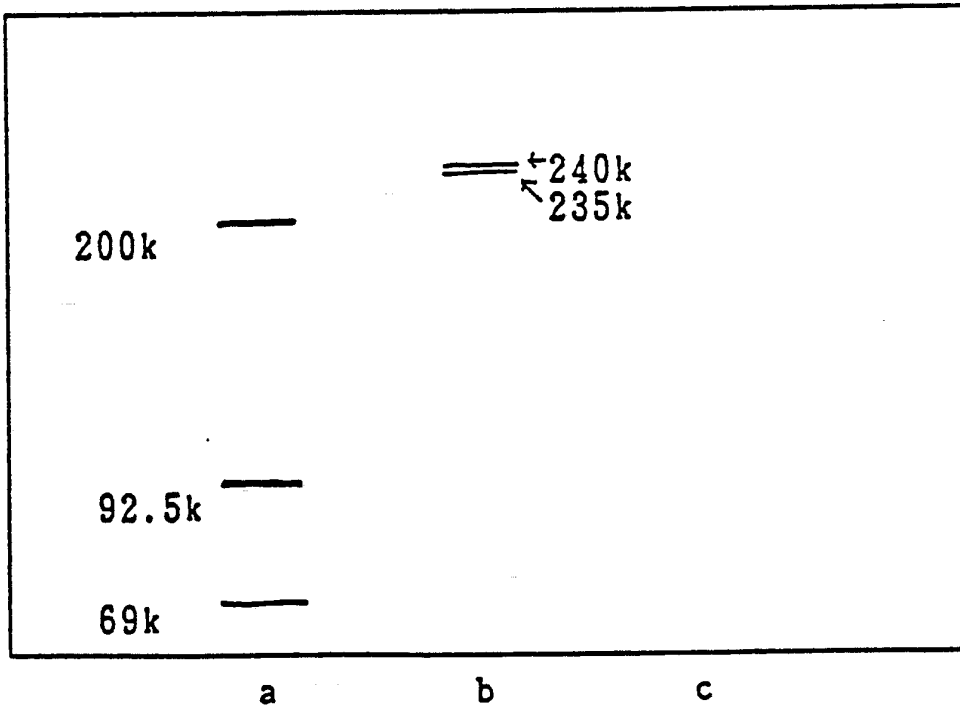


fig.2

2/3

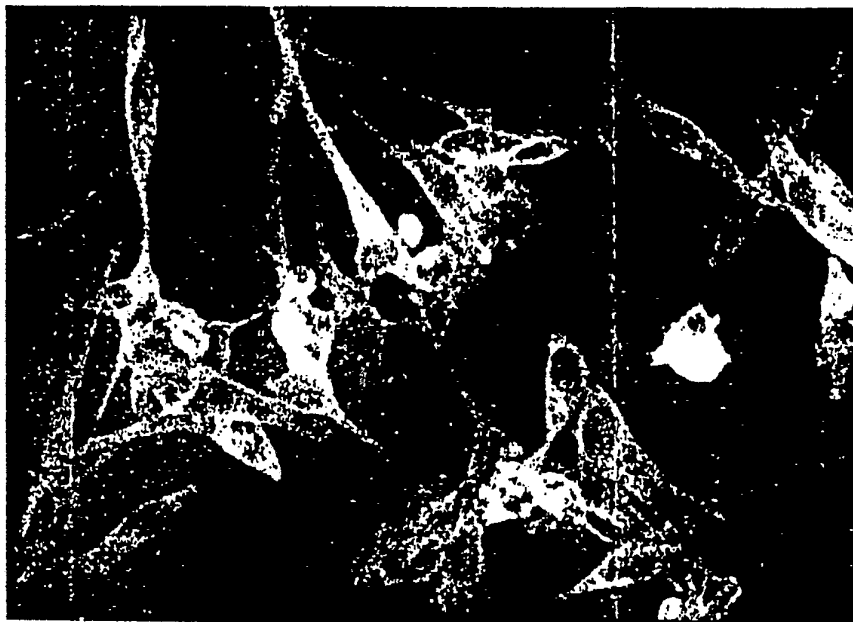


fig.3

8720643.

3/3

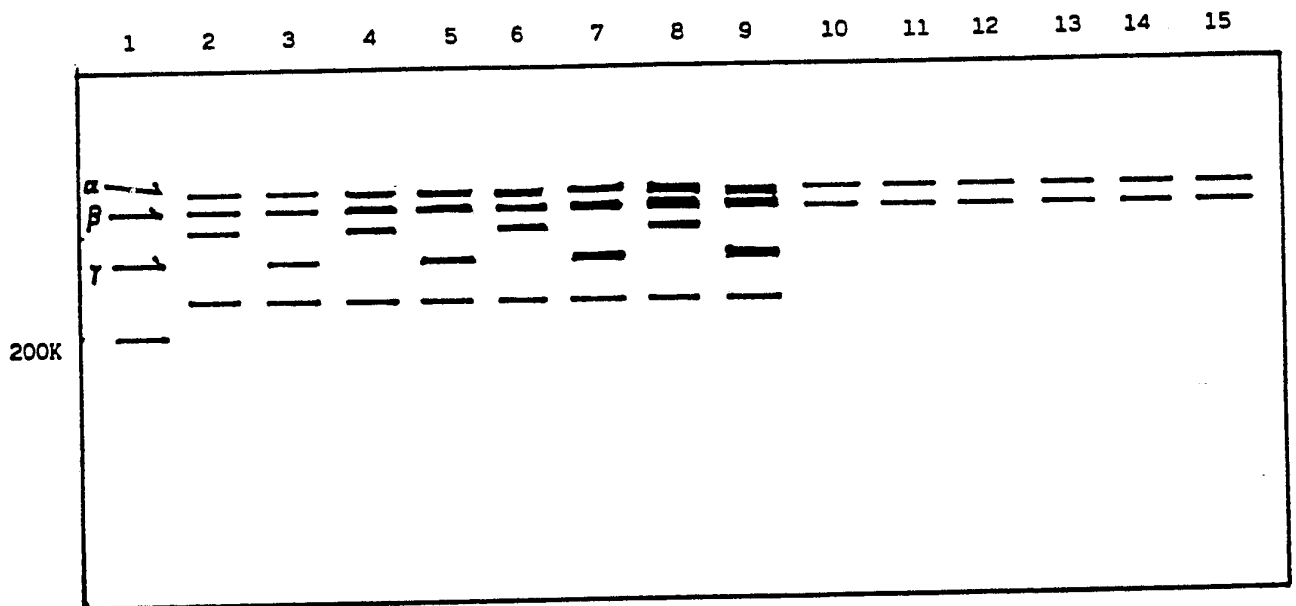


fig.4